

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



Image

PTO/SB/21 (05-03)

Approved for use through 04/30/2003. OMB 0651-0031
U.S. Patent and Trademark Office; U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE

Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it displays a valid OMB control number.

| | | |
|---|------------------------|---------------------------|
| TRANSMITTAL FORM (to be used for all correspondence after initial filing) | Application Number | 10/031,520 |
| | Filing Date | January 17, 2002 |
| | First Named Inventor | Qi et al. |
| | Art Unit | 1651 |
| | Examiner Name | Prats, Francisco Chandler |
| Total Number of Pages in This Submission | Attorney Docket Number | CSI3-PT001 |

| ENCLOSURES (Check all that apply) | | |
|--|---|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> Fee Transmittal Form | <input type="checkbox"/> Drawing(s) | <input type="checkbox"/> After Allowance communication to Group |
| <input checked="" type="checkbox"/> Fee Attached | <input type="checkbox"/> Licensing-related Papers | <input type="checkbox"/> Appeal Communication to Board of Appeals and Interferences |
| <input checked="" type="checkbox"/> Amendment/Reply | <input type="checkbox"/> Petition | <input type="checkbox"/> Appeal Communication to Group (Appeal Notice, Brief, Reply Brief) |
| <input type="checkbox"/> After Final | <input type="checkbox"/> Petition to Convert to a Provisional Application | <input type="checkbox"/> Proprietary Information |
| <input type="checkbox"/> Affidavits/declaration(s) | <input type="checkbox"/> Power of Attorney, Revocation Change of Correspondence Address | <input type="checkbox"/> Status Letter |
| <input checked="" type="checkbox"/> Extension of Time Request | <input type="checkbox"/> Terminal Disclaimer | <input checked="" type="checkbox"/> Other Enclosure(s) (please identify below): |
| <input type="checkbox"/> Express Abandonment Request | <input type="checkbox"/> Request for Refund | Copy of "Experiment Report of the Research regarding the Components in the Proteoglycan Composition", along with English Translation Abstract |
| <input type="checkbox"/> Information Disclosure Statement | <input type="checkbox"/> CD, Number of CD(s) _____ | |
| <input type="checkbox"/> Certified Copy of Priority Document(s) | Remarks | |
| <input type="checkbox"/> Response to Missing Parts/Incomplete Application | | |
| <input type="checkbox"/> Response to Missing Parts under 37 CFR 1.52 or 1.53 | | |

| SIGNATURE OF APPLICANT, ATTORNEY, OR AGENT | |
|--|----------------------------------|
| Firm or Individual name | Ryan W.O'Donnell Reg. No. 53,401 |
| | Volpe and Koenig, P.C. |
| Signature | |
| Date | March 2, 2004 |

| CERTIFICATE OF TRANSMISSION/MAILING | |
|---|------------------|
| I hereby certify that this correspondence is being facsimile transmitted to the USPTO or deposited with the United States Postal Service with sufficient postage as first class mail in an envelope addressed to: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 on the date shown below. | |
| Typed or printed name | Ryan W.O'Donnell |
| Signature | |
| Date | March 2, 2004 |

This collection of information is required by 37 CFR 1.5. The information is required to obtain or retain a benefit by the public which is to file (and by the USPTO to process) an application. Confidentiality is governed by 35 U.S.C. 122 and 37 CFR 1.14. This collection is estimated to 12 minutes to complete, including gathering, preparing, and submitting the completed application form to the USPTO. Time will vary depending upon the individual case. Any comments on the amount of time you require to complete this form and/or suggestions for reducing this burden, should be sent to the Chief Information Officer, U.S. Patent and Trademark Office, U.S. Department of Commerce, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450. DO NOT SEND FEES OR COMPLETED FORMS TO THIS ADDRESS. SEND TO: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.

If you need assistance in completing the form, call 1-800-PTO-9199 and select option 2.



VERIFICATION OF TRANSLATION

Re: U.S. Patent Appln. NO. 10/031,520

I, Ping HE, of B11th Floor, Focus Place, 19 Financial Street, Beijing,
100032, P. R. China

Hereby declare that I am the translator of the document attached and
certify that the following is true translation to the best of my knowledge
and belief.

Signature of translator

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Ping HE", written over a horizontal line.

Ping HE

Dated this 9 day of February, 2004



Experiment Report of the Research regarding the Components in the Proteoglycan Composition

Testing Party: Shanghai Institute of materia Medica, China Science
Academy

Person in
Charge of the Test: FANG Jinian

Testing Designer: DONG Qun, FANG Jinian

Tester: DONG Qun, Yao Jian

Testing Date: August, 2000 – December, 2000

Place of Keeping
The Original

Documents: Shanghai Institute of of materia Medica, China Science
Academy

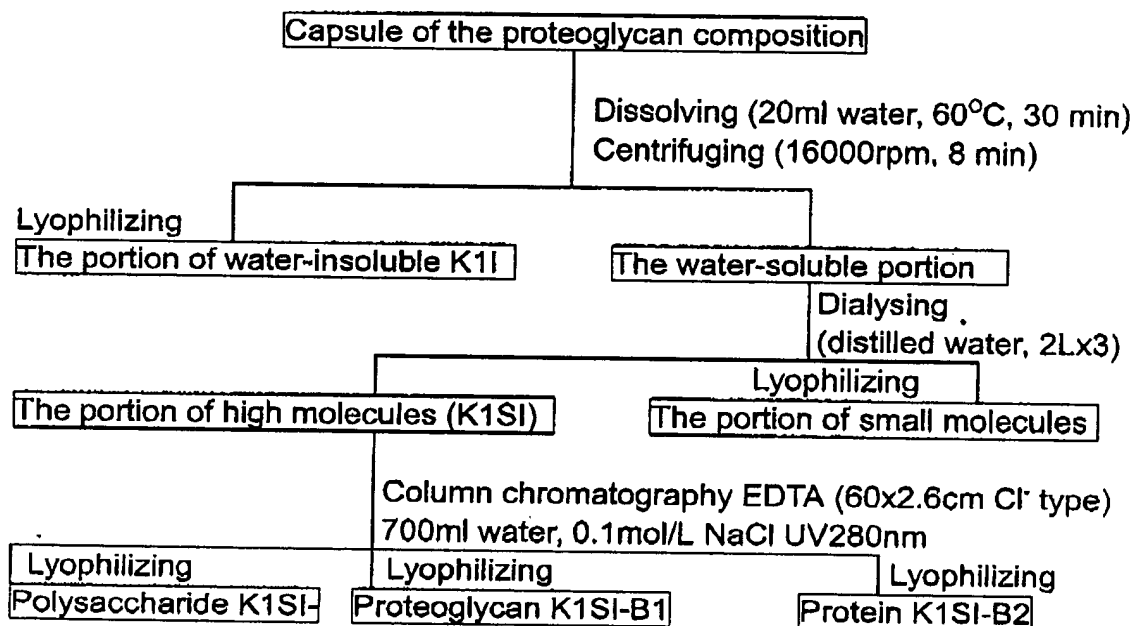
Contact Person: FANG Jinian
Telephone 86-21-64311833. Ext. 601
E-mail jnfang@mail.shcnc.ac.cn

Abstract

The proteoglycan composition with a batch number of 000810 has a 25.8% of total saccharide content and a 48.0% of total protein content including oligopeptides and amino acids. Three major portions can be obtained upon separation, including the portion of 44.0% of water-soluble small molecules, the portion of 23.0% of water-soluble high molecules and the portion of 25.3% of water-insoluble substances. It has been found that the portion of water-soluble, high molecules consists of mainly 52.6% of proteoglycans, 28.3% of polysaccharides and 19.1% of proteins.

It has been concluded that the portion of water-soluble high molecules of the proteoglycan composition is composed of mainly proteoglycan wherein the fraction of polysaccharide consists of rhamnose, arabinose, xylose, galactose, glucose and uronic acids and the fraction of protein consists of 17 amino acids including aspartic acid. In the portion of water-soluble high molecules, the content of polysaccharide is 28.3% which consists of mainly glucose. Therefore said polysaccharide is a glucan. The portion of water-insoluble is proved to be an organic substance with smaller polarity since the fraction can be dissolved in organic solvents such as DMSO.

The analytic and experimental process for the components of the proteoglycan composition



新生物制品:一类

补充资料编号: 2

蛋白多糖组合 各类组分的研究资料

试 验 单 位: 中国科学院上海药物研究所

试验负责人: 方积年

试验设计者: 董群, 方积年

试 验 者: 董群, 姚健

试 验 日 期: 2000 年 8 月-2000 年 12 月

原始资料保存处: 中国科学院上海药物研究所

联 系 人: 方积年

联系电话: (021)-64311833x601

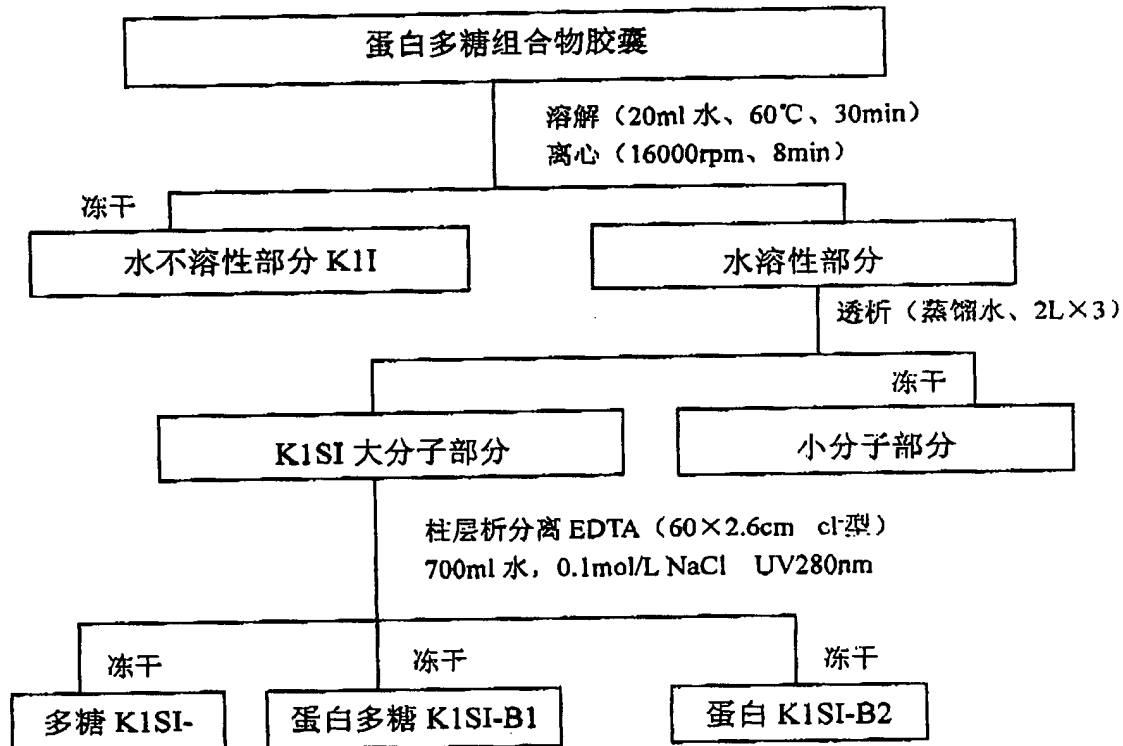
电子信箱: jnfang@mail.shcnc.ac.cn

一. 摘要

批号为 000810 的蛋白多糖组合物，总糖含量为 25.8%，包括寡肽及氨基酸的总蛋白含量为 48.0%。经分离获得水溶性小分子，大分子及水不溶性三大部分，其所占比例分别为 44.0%，23.0%，25.3%。研究发现水可溶性大分子部分主要由蛋白多糖、多糖及蛋白质三部分组成，其在大分子中所占的比例分别为 52.6%、28.3%和 19.1%。

由此得出结论：蛋白多糖组合物的水溶性大分子部分主要由蛋白多糖组成，其中多糖部分由鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、半乳糖、葡萄糖及糖醛酸组成。蛋白质部分由天冬氨酸等 17 种氨基酸组成。多糖含量占水溶性大分子的 28.3%，主要由葡萄糖组成，所以该多糖为葡聚糖。水不溶性部分可以溶解于 DMSO 等有机溶剂中，证明是一种极性较小的有机物质。

蛋白多糖组合物的各组分析试验过程



二. 蛋白多糖组合物总糖含量的测定:

苯酚-硫酸法是目前应用最广泛的测定糖含量的方法, 其原理是在强酸条件下将待测的糖样品水解成单糖, 单糖在浓硫酸中脱水生成糠醛, 进而与苯酚形成黄棕色复合物, 利用比色法可进行测定, 该方法特别适用于寡糖、多糖或糖复合物中糖含量的测定。

1. 试剂

苯酚(分析纯), 重蒸后配成 50g/L(5%)水溶液

浓硫酸(分析纯, $d=1.84\text{g}/\text{cm}^3$)

标准溶液: 取已干燥的 D-葡萄糖 20mg, 溶于 100ml 重蒸水中

样液: 同标准液方法配制。

2. 方法

1) 标准曲线制作:

葡萄糖标准溶液按表 1 的方法稀释。

测定时取稀释后的标准液 0.2ml, 加 5%苯酚 0.4ml, 振荡后加浓硫酸 2.0ml, 室温放置 30min, 分别测定 OD_{490} , 以 OD_{490} 对糖含量作图制作标准曲线。

2) 样品测定:

原液(200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)2.0ml 加水 2.0ml(最终浓度 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 取 0.2ml 按标准液同样方法测定 490nm 的吸光度。

补充材料 2

表 1 标准液的稀释

| No | 原液 | H ₂ O | 浓度 (μg/ml) | 含量 (μg/2.6ml) |
|----|-----|------------------|------------|---------------|
| 1 | 0.5 | 2.8 | 30 | 6 |
| 2 | 1.0 | 2.3 | 60 | 12 |
| 3 | 1.0 | 1.2 | 90 | 18 |
| 4 | 2.0 | 1.3 | 120 | 24 |
| 5 | 2.0 | 0.7 | 150 | 30 |

3. 结果

根据吸光值从标准曲线上求得样品的总糖浓度，然后按以下公式计算总糖含量。

总糖含量 = 标准曲线上的总糖浓度 (μg/ml) × 定容体积 × 10⁻⁶ /

所取干燥样品质量(g) × 100%

由此测得蛋白多糖组合物的总糖含量为 25.8%。

三. 蛋白多糖组合物蛋白质含量的测定 (Lowry 法)

1. 试剂:

- 1) 试剂 A (碱性铜试剂): 取无水碳酸钠 (AR) 5.0g 和氢氧化钠 1.0g, 加蒸馏水 15ml 微热溶解; 另取酒石酸钠 (Na₂C₄H₄O₆ · 2H₂O) 0.05g 和五水硫酸铜 0.025g, 亦加蒸馏水 15ml 微热溶解。冷却后将上述两溶液混合, 加水定容至 50ml。
- 2) 试剂 B (酚试剂): BDH Chemicals Ltd 产品, 使用前稀释一倍。
- 3) 标准牛血清白蛋白溶液 (100 μg/ml)

补充资料 2

2. 待测样品溶液:

第二部分中的原液 ($200 \mu\text{g/ml}$) 稀释 1 倍, 蛋白含量约 $20-100 \mu\text{g/ml}$ 。

3. 测定方法

1) 标准曲线的绘制

取六支试管按 0-5 编号, 按下表分别加入各试液。

| 管号 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| BSA (ml) | 0 | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 1.0 |
| H ₂ O | 4.5 | 4.3 | 4.1 | 3.9 | 3.7 | 3.5 |
| 试剂 A | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| 试剂 第一次 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 |
| B 第二次 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 |

试剂 A 加完后混匀, 静置 10min, 再加试剂 B, 第一次试剂 B 加完后 10 分钟再加第二次, 每次加完后均应混匀, 全部加完后置 55°C 水浴保温 5 分钟。冷却后以 0 号为参比测定 OD_{660} 。以 BSA 含量为横坐标, OD_{660} 为纵坐标作标准曲线。

待测样液按上表 5 号管中的方法测定 OD_{660} , 从标准曲线上求出蛋白质含量。

4. 测定结果

从标准曲线上求得蛋白多糖组合物中总蛋白的含量为 48.0%。

补充资料 2

四. 糖醛酸含量的测定 (间苯基苯酚法):

1. 试剂

- 1) 浓硫酸/硼酸钠试剂: 取 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0.477g, 加浓硫酸溶解并定溶至 100ml。
- 2) 间苯基苯酚试剂: 取 0.5g NaOH, 加水溶解至 100ml, 再加入间苯基苯酚 0.15g, 搅拌溶解。
- 3) 标准品溶液: 取葡萄糖醛酸 10mg, 溶于水, 并定溶至 100ml。
- 4) 样品溶液: 取待测样品 10mg, 加水溶解, 定溶至 50ml。

2. 测定方法

| 管号 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-----------|------|------|------|------|------|------|
| 标准液 (ml) | 0 | 0.08 | 0.16 | 0.24 | 0.32 | 0.40 |
| 水 (ml) | 0.40 | 0.32 | 0.24 | 0.16 | 0.08 | 0 |
| A 试剂 (ml) | 2.4 | 2.4 | 2.4 | 2.4 | 2.4 | 2.4 |
| B 试剂 (ml) | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.04 |

取试管 6 支, 按上表量加入标准液, 水和 A 试剂, 再冰浴中降温, 振荡, 混合均匀, 100°C 水浴 5min, 冰浴冷却, 加入 B 试剂 0.04ml, 混合均匀, 在 20min 内测定 OD_{520} 。以吸光度对葡萄糖醛酸含量作图, 得标准曲线。

样液按上表 5 管进行操作, 测出相应的吸光度, 根据标准曲线, 计算糖醛酸百分含量。

3. 测定结果

按以上方法测定，蛋白多糖组合中糖醛酸含量为 13.3%。

五. 多糖及蛋白多糖中单糖组成的测定：

1. 方法

取待测样品 5mg，加入 2mol/L 三氟乙酸(TFA) 5ml, 110°C 水解 2h，加甲醇，减压蒸发至完全干燥，除去 TFA。样品溶于 0.2ml 水中，取 10 μ l 进行 TLC 分析，TLC 在纤维素薄层板上进行，展开剂为：乙酸乙酯-吡啶-乙酸-水 (5: 5: 1: 3, v/v)，待展开剂挥干后，用苯胺-邻苯二甲酸试剂显色。剩余样品溶于 2ml 水中，加入 30mg 硼氢化钠，室温下还原 2h，加乙酸数滴，使未反应的硼氢化钠分解，加甲醇反复蒸干，再加入乙酸酐 2ml 于 100°C 反应 1h，用氯仿 10ml 萃取生成的糖醇乙酸酯，水洗涤氯仿层，氯仿层用无水硫酸钠干燥后，浓缩至小体积，用气相色谱法测定（附图 1, 2），参照各种单糖衍生物的标准图谱（附图 3）确定糖基的组成，摩尔比根据各种单糖在氢焰离子检测器的响应因子进行校正。

2. 测定结果

多糖中的单糖残基由单一葡萄糖组成，所以该多糖为葡聚糖。蛋白多糖中的多糖部分的单糖由鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、半乳糖、葡萄糖组成，其摩尔比为 1.80:0.33:1.10:0.44:1.00，另外还含有 13.3% 的糖醛酸，由此说明该蛋白多糖中的多糖部分系由六种单糖残基构成的酸性杂多糖。

六. 蛋白质中氨基酸组成的测定

取待测样品 5mg, 置 1.5×15cm 试管中, 加入 4ml 6mol/L HCl, 在氮气保护下封管, 于 105°C 水解 24h, 减压蒸干, 除去 HCl, 残渣溶于 0.1ml 水中, 稀释 50 倍, 取 0.5ml 用氨基酸自动分析仪测定, 分析结果见第七部分中 (2) (3) 之峰 2, 峰 3 之分析结果。

七. 样品的分离:

(一) 分离步骤

取蛋白多糖组合物样品 2.0g 加水 20ml 加热至 60°C、恒温搅拌 30min 溶解, 离心分离 (16000rpm, 8min), 不溶物冷冻干燥, 重 0.51g, 为褐色疏松固体 (K1I), 可溶于 DMSO 等有机溶剂中, 是一种极性较小的有机溶剂。上清液对蒸馏水透析 (2L×3), 分别收集可透析及不可透析的部分, 浓缩至小体积, 冷冻干燥, 透析袋外的部分 (KSO) 重 0.88g, 为黄色粉末, 易吸潮, 透析袋内的部分 (K1SI) 重 0.46g, 为微黄色疏松固体。不能透析的部分用 DEAE-纤维素阴离子交换柱 (60×2.6cm, Cl⁻型) 层析进行分离, 先用水 700ml 洗脱, 再以 0.1mol/L NaCl 线性梯度洗脱, 糖含量用苯酚-硫酸法检测, 蛋白质含量用 280nm 紫外吸收检测。分别得到多糖, 糖蛋白和蛋白质三个部分 (如附图 6 所示), 收集洗脱液, 透析, 袋内液冷冻干燥,

根据重量计算其含量。

(二) 各组分的鉴别

1. 水不溶物部分，即 K1I，为褐色疏松固体，占蛋白多糖组合物的 25.3%，该组分在乙醇、丙酮等有机溶剂中不溶解，但可溶于 DMSO，不溶于 1mol/L 盐酸或 1mol/L 氢氧化钠溶液中。
2. 水溶性部分经透析后，透过部分即为分子量小于 3000 的小分子物质，未透过部分即为大分子物质。
 - 1) 小分子物质，即 K1SO：占蛋白多糖组合物的 44.0%，该部分对茚三酮试剂呈紫色，说明含氨基酸；苯胺-邻苯二甲酸试剂检测呈阴性，说明不含还原糖，但对苯酚-硫酸试剂呈弱的阳性反应，说明含糖苷类化合物。由此结论：K1SO 中含水溶性小分子化合物，包括氨基酸、糖苷、及其它小分子。
 - 2) 大分子物质，即 K1SI：占蛋白多糖组合物的 23.0%，该部分经 DEAE-纤维素柱层析，如附图 6 所示，出现三个峰，分别鉴定如下：
 - (1) 峰 1 (K1SI-A) 在 OD_{280} 仅有微弱的吸收，但苯酚-硫酸反应十分强烈，说明为一多糖，含量为 6.5% (占起始原料 2.0g

附录 2

的百分比), 在大分子中占 28.3%, TLC 和 GC 分析的结果表明它仅由 D-葡萄糖残基构成, 所以为葡聚糖 (附图 1)。

(2) 峰 2 (K1SI-B1) 在 280nm 有较强的紫外吸收, 且有明显的苯酚-硫酸反应, 这说明它既含有蛋白质又含有多糖, 应为蛋白多糖复合物, 其含量为总量的 12.1%, 在大分子部分中占 52.6%。定量测定表明其中含中性糖 35.3%, 糖醛酸 13.3%, 蛋白质 32.0%。其中中性糖包括鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、半乳糖、葡萄糖, 摩尔比为 Rha: Ara: Xyl: Gal: Glc = 1.80: 0.33: 1.10: 0.44: 1.00 (如附图 2 所示), 蛋白质部分由 17 种氨基酸组成 (如附图 4, 表 2 所示), 其含量如下。

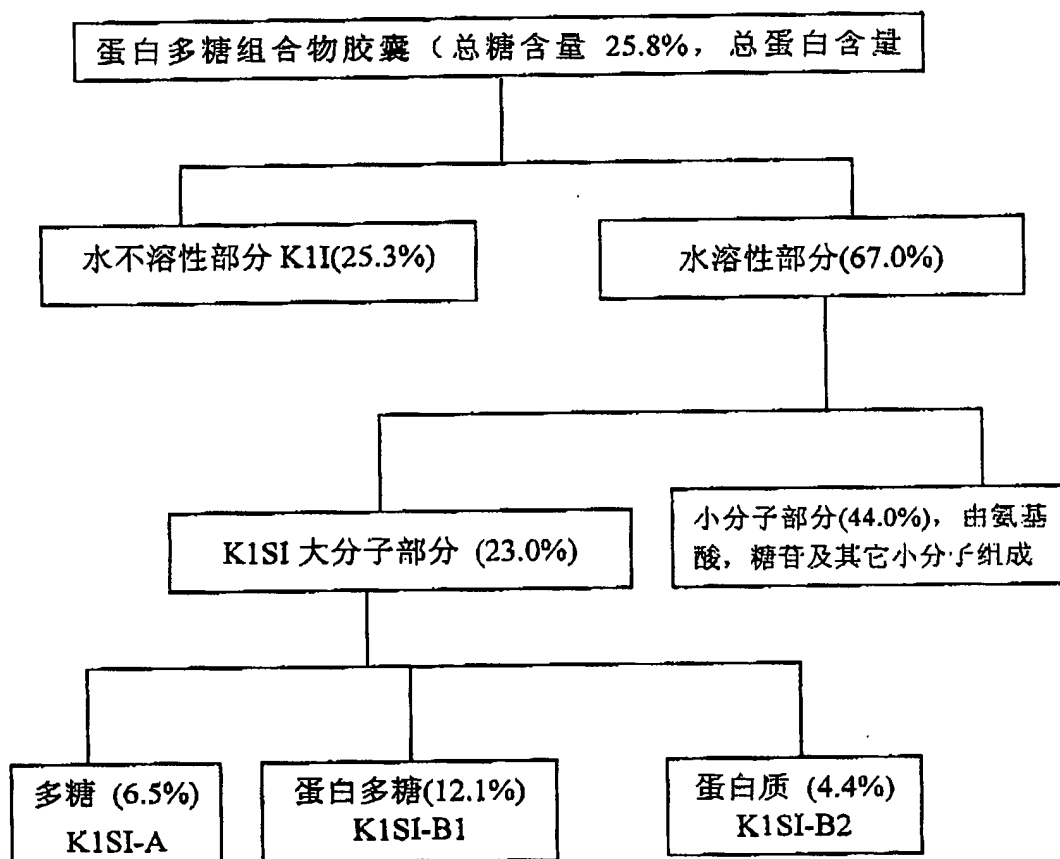
| 氨基酸 | 摩尔比 | 氨基酸 | 摩尔比 |
|----------|------|----------|------|
| 天冬氨酸 Asp | 6.67 | 甲硫氨酸 Met | 0.46 |
| 苏氨酸 Thr | 2.96 | 异亮氨酸 Ile | 2.18 |
| 丝氨酸 Ser | 2.24 | 亮氨酸 Leu | 3.14 |
| 谷氨酸 Glu | 5.23 | 酪氨酸 Tyr | 0.61 |
| 脯氨酸 Pro | 0.78 | 苯丙氨酸 Phe | 1.15 |
| 甘氨酸 Gly | 4.84 | 赖氨酸 Lys | 1.15 |
| 丙氨酸 Ala | 3.50 | 组氨酸 His | 0.21 |
| 胱氨酸 Cys | 0.23 | 精氨酸 Arg | 1.06 |
| 缬氨酸 Val | 2.15 | | |

补充资料 2

(3) 峰 3 (K1SI-B2) 在 280nm 有较强的紫外吸收, 但苯酚-硫酸反应呈阴性, 说明它不含糖, 所以主要由蛋白质构成, 其含量为总量的 4.4%, 在大分子部分中占 19.1%, 氨基酸组成如下 (如附图 5, 表 3 所示)。

| 氨基酸 | 摩尔比 | 氨基酸 | 摩尔比 |
|----------|------|----------|------|
| 天冬氨酸 Asp | 3.03 | 甲硫氨酸 Met | 0.40 |
| 苏氨酸 Thr | 1.09 | 异亮氨酸 Ile | 0.89 |
| 丝氨酸 Ser | 0.79 | 亮氨酸 Leu | 1.23 |
| 谷氨酸 Glu | 3.36 | 酪氨酸 Tyr | 0.38 |
| 脯氨酸 Pro | 0.80 | 苯丙氨酸 Phe | 0.62 |
| 甘氨酸 Gly | 2.69 | 赖氨酸 Lys | 0.63 |
| 丙氨酸 Ala | 1.85 | 组氨酸 His | 0.15 |
| 胱氨酸 Cys | 0.21 | 精氨酸 Arg | 0.50 |
| 缬氨酸 Val | 0.93 | | |

补充资料 2

总表:**蛋白多糖组合物的各组分及其含量**

参考文献 2

参考文献

1. 张志花, 方积年: 云芝糖肽在高效凝胶柱上的色谱行为的研究, 色谱, 15 (2): 150 (1997)。
2. 张劲松, 方积年: 白木通多糖的研究, 药学学报, 32 (6): 438 (1997)。
3. 董群, 丁思炜, 方积年: 山豆根木葡聚糖的研究, 中国生物化学与分子生物学学报, 14 (6): 746 (1998)。
4. Qun Dong, JN Fang: Structural features of a heteroxylan from *Sophora subprostrata*, Phytochem. 50: 81 (1999) .
5. 王顺春, 方积年: 徐长卿中阿拉伯半乳聚糖 CP64 的化学结构, 药学学报, 34 (10) 755 (1999)。
6. 王顺春, 方积年: 徐长卿多糖的分离纯化与化学结构研究 (I), 中国药学杂志, 34 (10): 656 (1999)。
7. 王顺春, 何巍, 方积年: 徐长卿中一种新葡聚糖化学结构的研究. 生物化学与生物物理学报, 32(4): 396 (2000)。

试验设计者: 董群, 方积年

试验者: 董群, 姚健

试验日期: 2000年8月-2000年12月

原始资料保存处: 中国科学院上海药物研究所